



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1636
Examiner : David Guzo
Serial No. : 08/975,982
Filed : November 21, 1997
Inventors : Martine Cerutti

CUSTOMER NO. 35811

: Hassan Chaabihi
: Gerard Devauchelle
: Laurent Gauthier
: Michel Kaczorek
: Marie-Paule LeFranc
: Marie-Alix Poul

Docket No.: 1225-00

Title : RECOMBINANT BACULOVIRUS
: AND USE THEREOF IN THE
: PRODUCTION OF MONOCLONAL
: ANTIBODIES

Confirmation No.: 1310

Date: September 29, 2003

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Mail Stop Issue Fee
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

RECEIVED
OCT 03 2003
TECH CENTER 1600/2900

Sir:

We submit herewith the certified copy of French Patent Application No. 94/01015, filed
January 31, 1994, the priority is hereby claimed.

Respectfully submitted,

T. Daniel Christenbury
Reg. No. 31,750
Attorney for Applicants

TDC:cc
(215) 656-3300

100



41

1636

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : 1636
Examiner : David Guzo
Serial No. : 08/975,982
Filed : November 21, 1997
Inventors : Martine Cerutti

CUSTOMER NO. 35811

: Hassan Chaabihi
: Gerard Devauchelle
: Laurent Gauthier
: Michel Kaczorek
: Marie-Paule LeFranc
: Marie-Alix Poul

Docket No.: 1225-00

Title : RECOMBINANT BACULOVIRUS
: AND USE THEREOF IN THE
: PRODUCTION OF MONOCLONAL
: ANTIBODIES

Confirmation No.: 1310

Date: September 29, 2003

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Certificate of Mailing Under 37 CFR 1.8

For

Postcard

Claim for Priority Under 35 U.S.C. §119
Certified Copy of French Appln. No. 94/01015

RECEIVED

OCT 03 2003

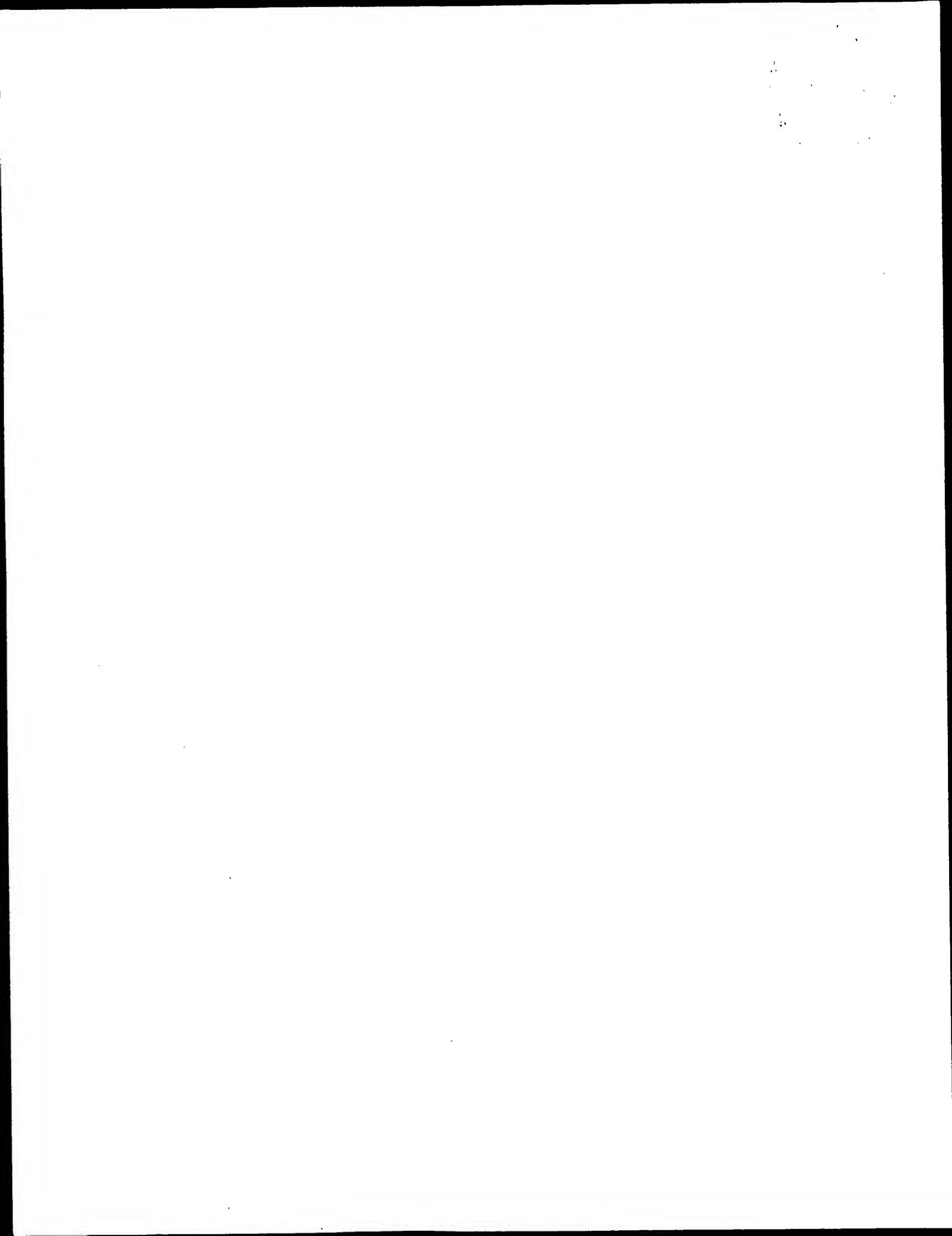
TECH CENTER 1600/2900

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as First Class Mail in an envelope addressed to Commissioner for Patents, Alexandria, VA 22313-1450, on the date appearing below.

Name of Applicant, Assignee, Applicant's Attorney
or Registered Representative:

Piper Rudnick LLP
Customer No. 035811

By: TRDate: 29 SEP 2003





BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

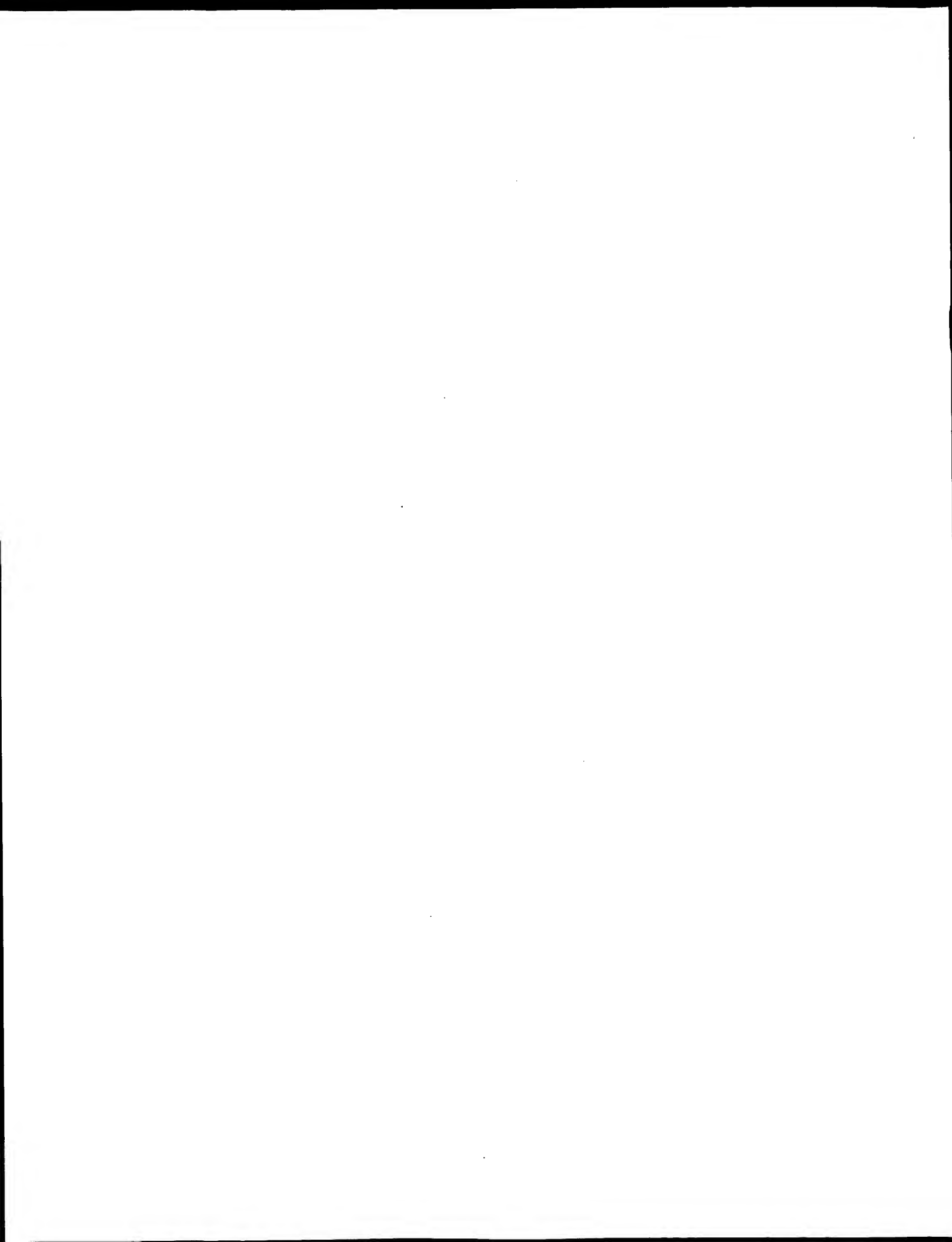
Fait à Paris, le 11 SEP. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04



REQUETE

EN DÉLIVRANCE D'UN
TITRE DE PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE *

2 OPTIONS OBLIGATOIRES au moment du dépôt (sauf pour le certificat d'utilité)

LE DEMANDEUR REQUIERT
L'ÉTABLISSEMENT DIFFERÉ
DU RAPPORT DE RECHERCHE *

☐ OUI
☒ NON

SI L'OPTION CHOISIE EST NON ET
SI LE DEMANDEUR EST UNE
PERSONNE PHYSIQUE IL
REQUIERT LE PAIEMENT
ÉCHELONNÉ DE LA REDEVANCE
DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ OUI
☐ NON

NATURE

NUMÉRO

DATE DE LA DEMANDE INITIALE

| | |
|---|-----------------------------------------------------------------------------|
| a | <input checked="" type="checkbox"/> BREVET D'INVENTION |
| b | <input type="checkbox"/> CERTIFICAT D'UTILITÉ |
| c | <input type="checkbox"/> DEMANDE DIVISIONNAIRE |
| d | <input type="checkbox"/> TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPEEN |

Pour c et d, précisez : Nature, N° et date de la
demande initiale

3 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE A QUI TOUTE LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET ORES
6, AVENUE DE MESSINE
75008 PARIS - FRANCE

5 RÉFÉRENCE DU CORRESPONDANT
MJPnd F872/1

6 TÉLÉPHONE DU CORRESPONDANT
45.62.75.00

7 TITRE DE L'INVENTION

BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION
D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

8 DEMANDEUR(S) : Nom et Prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination et forme juridique

PROTEINE PERFORMANCE
Société Anonyme

N° SIREN.

9 ADRESSE(S) COMPLÈTE(S)

Route d'Alès
30380 SAINT CHRISTOL-LES-ALES
FRANCE

PAYS

FRANCE

10 NATIONALITÉ(S)

FRANÇAISE

11 INVENTEUR(S)

LE DEMANDEUR EST L'UNIQUE
INVENTEUR *

☐ OUI

Si la réponse est non voir notice explicative

☒ NON

12

SI LE DEMANDEUR EST UNE PERSONNE
PHYSIQUE NON IMPOSABLE, IL
REQUIERT OU A REQUIS LA RÉDUCTION
DES REDEVANCES *

☐ OUI

☐ NON

☒ DE DÉPÔT

REDEVANCES VERSÉES

☒ DE RAPPORT DE RECHERCHE

☐ DE REVDICATION DE PRIORITÉ

☒ DE REVDICATION (à partir de la 11e)

13 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE
LA DATE DE DÉPÔT D'UNE
DEMANDE ANTÉRIEURE

PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO

14

DIVISIONS

ANTÉRIEURES A LA
PRÉSENTE DEMANDE

N°

N°

N°

N°

15 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE NOM ET QUALITÉ DU SIGNATAIRE N° D'INSCRIPTION

I. ORES (N° 92-1187)
CABINET ORES

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ A LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE A L'INPI

Division Administrative des Brevets

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° d'enregistrement national

94 01015

Titre de l'invention :

BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA
PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

Le (s) soussigné (s)

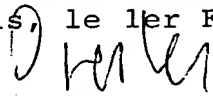
CABINET ORES
6, Avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE**désigne (nt) en tant qu'inventeur (s)** (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom
patronymique) :

- 1° CERUTTI Martine
2997, Route de Montèze, 30380 SAINT CHRISTOL-LES-ALES, FRANCE
- 2° CHAABIHI Hassan
30B, Avenue Jules Guesde, 30100 ALES, FRANCE
- 3° DEVAUCHELLE Gérard
137, Chemin de l'Espervette, 30380 SAINT CHRISTOL-LES-ALES
FRANCE
- 4° GAUTHIER Laurent
186, Grande rue, 30100 ALES, FRANCE
- 5° KACZOREK Michel
81, Boulevard de la Lironde, 34980 MONTFERRIER, FRANCE
- 6° LEFRANC Marie-Paule
4, rue du Vallon, 34830 CLAPIERS, FRANCE
- 7° POUL Marie-Alix
10, rue de Docteur Roux, 34000 MONTPELLIER, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient
(société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du demandeur ou du mandataire

Paris, le 1er Février 1995


M.J. PRESLES
CABINET ORES (N° 93-2009)

BACULOVIRUS RECOMBINANT ET SON UTILISATION POUR LA PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.

La présente Invention est relative à un baculovirus modifié et à son utilisation pour la production d'immunoglobulines.

Les anticorps ou immunoglobulines sont produits par les lymphocytes B. Chaque lymphocyte B sécrète un seul type d'anticorps. Chaque molécule d'immunoglobuline est constituée de l'association de deux chaînes lourdes (H) et deux chaînes légères (L) reliées par des ponts disulfures. Chaque chaîne est constituée d'une partie variable (VH et VL) qui possède le site de fixation à l'antigène et d'une partie constante (CH et CL). Il existe plusieurs types de chaînes lourdes ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$, α , ϵ , μ) qui définissent les différentes classes d'immunoglobulines (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM...) et deux types de chaînes légères : (chaîne kappa (κ) et chaîne lambda (λ)). Par exemple les anticorps de classe IgG1 sont constitués de deux chaînes lourdes de type $\gamma 1$ et de deux chaînes légères κ ou lambda λ . Les parties variables sont le support de la spécificité de l'anticorps pour son antigène.

Pour chaque chaîne d'un anticorps donné, la région variable est constituée de plusieurs domaines dont certains sont plus ou moins conservés. Le réarrangement de ces régions variables est le fruit d'une recombinaison au niveau de l'ADN génomique des lymphocytes B..

Les anticorps monoclonaux sont classiquement produits à partir de cultures de lignées d'hybridomes, chaque lignée, dérivée d'un seul lymphocyte B, sécrétant un seul type d'immunoglobuline.

Les anticorps monoclonaux (MAbs) sont utilisés couramment aujourd'hui pour le diagnostic in vitro, et leur utilisation en thérapie et pour le diagnostic in vivo connaît un développement prometteur. Ce développement est toutefois freiné par le fait que les

seuls anticorps monoclonaux dont on puisse disposer relativement facilement et en quantité suffisante à partir des cultures d'hybridomes sont des anticorps monoclonaux de rongeurs. Or, les immunoglobulines de
5 rongeurs (et de manière générale les immunoglobulines non-humaines) induisent chez l'homme une réponse immune indésirable, ce qui limite considérablement leur intérêt thérapeutique.

De nombreuses recherches ont été effectuées
10 dans le but d'obtenir des immunoglobulines ne possédant pas cet inconvénient ; il a en particulier été proposé de fabriquer par génie génétique des anticorps recombinants, dans lesquelles la plus grande partie possible de la molécule est dérivée d'un gène d'origine humaine.

15 Les anticorps obtenus, dans lesquels seuls les domaines variables sont d'origine non-humaine, sont dénommés anticorps chimériques. Il existe également des anticorps dits humanisés, dont les séquences des régions variables non directement impliquées dans la
20 reconnaissance de l'antigène ont été remplacées par des séquences d'origine humaine. Dans les deux cas, la majeure partie de la molécule d'immunoglobuline est dérivée d'un gène d'origine humaine.

L'obtention d'anticorps par génie génétique
25 nécessite toutefois le choix d'un hôte d'expression approprié, assurant les modifications post-traductionnelles nécessaires pour reproduire les propriétés de l'anticorps natif. Dans ce but il a été proposé, entre autres, d'utiliser le système
30 baculovirus/cellules d'insectes.

Les baculovirus sont utilisés couramment
comme vecteurs pour l'expression de gènes hétérologues, placés sous contrôle des promoteurs viraux, dans des
cellules d'insectes infectées. Le promoteur de la
35 polyédrine ou bien celui de la p10 (protéines produites en grande quantité pendant la phase très tardive du cycle

de réplication viral) sont ainsi fréquemment utilisés dans ce but.

5 HASEMAN et CAPRA [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3942-3946 (1990)], PUTLITZ et al. [Bio/Technology, 8, 651-654, (1990)], REIS et al. [Bio/Technology, 10, 910-912, (1992)] ont ainsi construit des baculovirus comportant deux copies du promoteur de la polyédrine, l'une de ces copies contrôlant l'expression d'un gène codant pour la chaîne lourde d'une immunoglobuline de souris, l'autre contrôlant l'expression d'un gène codant pour la chaîne légère de la même immunoglobuline. Les cellules d'insectes infectées par ces baculovirus ont sécrété des immunoglobulines possédant sensiblement les mêmes propriétés que les anticorps d'origine lymphocytaire, qui ont servi de modèle. Cependant, la structure des baculovirus modifiés de la sorte ne se maintient pas au-delà de quelques cycles de réplication virale.

20 La présente Invention a pour but de produire à la fois la chaîne lourde (H) et la chaîne légère (L) d'un anticorps donné dans une cellule d'insecte, en utilisant un vecteur d'expression dérivé d'un baculovirus, ne présentant pas les inconvénients des vecteurs d'expression du même type utilisés dans l'art antérieur pour la production d'immunoglobulines.

25 Dans ce but les Inventeurs ont construit un baculovirus double recombinant dans lequel la séquence codante de chacune des deux chaînes H et L est sous le contrôle d'un promoteur fort différent.

30 La présente Invention a pour objet un baculovirus recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend :

35 - une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne H d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort de

baculovirus, ou d'un dérivé dudit premier promoteur, et ;

- une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne L d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous
5 contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort de baculovirus, ou d'un dérivé dudit second promoteur ;
le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents, l'un des promoteurs étant situé à l'emplacement occupé chez le
10 baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre étant situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

A titre d'exemple de promoteurs forts utilisables pour la mise en oeuvre de la présente
15 Invention, on citera les promoteurs de la polyédrine et de P10 des baculovirus AcMNPV ou SlMNPV. D'autre part, on entend par "dérivé de promoteur" un promoteur synthétique ou recombinant, obtenu à partir d'un promoteur de
20 baculovirus, et fonctionnel en cellules d'insectes ; à titre d'exemple on citera le promoteur synthétique décrit par WANG et al, [Gene, 100, 131-137, (1991)].

Selon un premier mode de réalisation d'un baculovirus recombinant conforme à la présente Invention, chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur
25 fort de baculovirus, tel que défini ci-dessus ; (ii) une séquence codant pour un peptide signal ; (iii) une séquence codant pour un domaine variable d'une chaîne H ou L d'immunoglobuline ; (iv) une séquence codant pour au moins une partie d'un domaine constant d'une chaîne H ou
30 L d'immunoglobuline.

Un tel baculovirus recombinant constitue un vecteur d'expression directement utilisable pour la production d'immunoglobulines dans une cellule d'insecte.

De préférence, la séquence codant pour le
35 peptide signal qui est placée sous contrôle du premier promoteur et la séquence codant pour le peptide signal

qui est placée sous contrôle du second promoteur sont deux séquences différentes.

Un grand nombre de séquences codant pour des peptides signaux fonctionnels en cellules d'insecte sont utilisables pour la mise en oeuvre de la présente Invention. A titre d'exemples non limitatifs, on citera les séquences codant pour les peptides signaux de l'acétylcholinestérase de Drosophile, de la trophoblastine ovine, des chaines H et L d'immunoglobulines, etc...

Selon un autre mode de réalisation d'un baculovirus recombinant conforme à la présente Invention, chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur fort de baculovirus, tel que défini ci-dessus ; (ii) une séquence codant pour un peptide signal, telle que définie ci-dessous ; (iii) au moins un site permettant l'insertion d'une séquence codant pour un domaine variable d'immunoglobuline entre la séquence codant pour la partie constante et la séquence codant pour le peptide signal ; (iv) une séquence codant pour au moins une partie d'un domaine constant d'immunoglobuline.

Chaque site permettant l'insertion de la séquence codant pour le domaine variable est choisi de façon à être unique dans le génome du baculovirus recombinant. A titre d'exemple, un site Bsu36I peut être inséré entre la séquence peptide signal et la séquence codant pour la partie constante de la chaine lourde, et un site Sse83-87I entre la séquence peptide signal et la séquence codant pour la partie constante de la chaine légère.

Par insertion d'une séquence codant pour un domaine variable d'immunoglobuline dans chacun de ces sites, on obtient un vecteur d'expression conforme au premier mode de réalisation décrit ci-dessus.

Les séquences codant pour les domaines constants et variables peuvent être de même origine, ou

d'origine différente ; il peut s'agir également de séquences synthétiques ou recombinantes. Avantageusement, la séquence codant pour le domaine constant est d'origine humaine ; la séquence codant pour le domaine variable peut être d'origine humaine ou au moins partiellement non-humaine, par exemple d'origine murine, etc

Selon encore un autre mode de réalisation préféré de la présente Invention, l'un des promoteurs est le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés, et l'autre est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés.

La présente Invention englobe des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention.

L'infection des cellules par un baculovirus double recombinant conforme à l'Invention résulte dans la production des chaînes H et L. Ces chaînes s'assemblent pour reconstituer l'anticorps monoclonal désiré qui est par la suite sécrété dans le milieu de culture.

La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'une immunoglobuline, caractérisé en ce que l'on met en culture des cellules d'insecte infectées avec un baculovirus recombinant conforme à l'invention, et en ce que l'on extrait ladite immunoglobuline du milieu de culture.

La présente Invention englobe également les immunoglobulines susceptibles d'être obtenues par le procédé ci-dessus.

La présente Invention a en outre pour objet un procédé de préparation d'un baculovirus recombinant tel que défini ci-dessus, lequel procédé est caractérisé en ce que :

- l'on prépare un premier plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne H d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort d'un baculovirus, ou d'un dérivé dudit premier promoteur ;

- l'on prépare un second plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne L d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort dudit baculovirus, ou d'un dérivé dudit second promoteur ;

le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents ;

et l'on procède à la recombinaison homologue de l'un et de l'autre desdits plasmides avec l'ADN d'un baculovirus.

La construction d'un baculovirus recombinant conforme à l'Invention se fait en utilisant les techniques classiques de clonage de gènes hétérologues chez les baculovirus.

Schématiquement, la construction des plasmides de transfert se fait en insérant dans un plasmide capable de se répliquer chez un hôte bactérien (en général *E. coli*), la région du gène de baculovirus (par exemple p10 ou polyédrine) à la place duquel on souhaite insérer les gènes codant pour les chaînes H ou L d'immunoglobuline. Dans cette région, la séquence codante du gène de baculovirus (et éventuellement la séquence promoteur dudit gène) est remplacée par la séquence codant pour la chaîne d'immunoglobuline à exprimer (et éventuellement par la séquence du promoteur sous contrôle duquel on souhaite exprimer cette chaîne d'immunoglobuline, s'il s'agit par exemple d'un promoteur "dérivé"). Le plasmide de transfert ainsi obtenu contient donc un insert comprenant une séquence hétérologue flanquée de séquences de baculovirus. On cotransfecte ensuite les cellules d'insecte avec l'ADN du vecteur de transfert ainsi réalisé et l'ADN du baculovirus, ce qui par recombinaison homologue entre l'ADN viral et les séquences de baculovirus flanquant la séquence hétérologue dans le plasmide, permet le transfert de la séquence étrangère du

plasmide vers le génome viral.

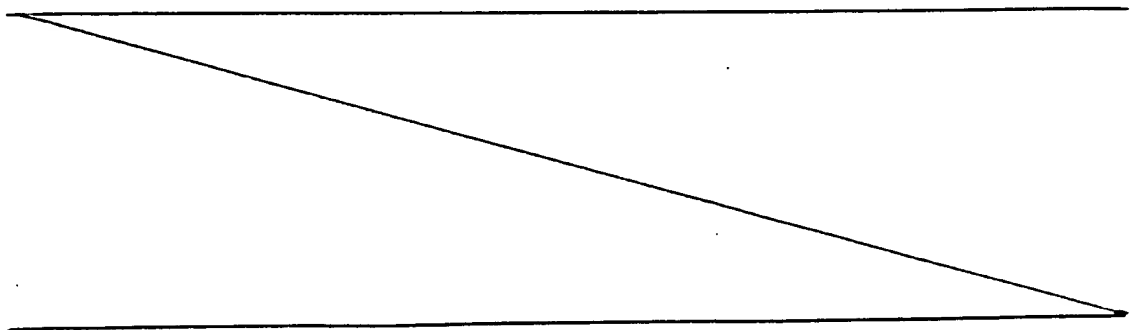
Après répllication de l'ADN viral dans les cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré la séquence
5 hétérologue.

Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à la présente Invention, les plasmides de transfert utilisés portent un insert comprenant : une cassette d'expression telle que définie ci-dessus, et de
10 part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

Selon une disposition particulièrement
15 avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, lesdites séquences de baculovirus sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

La présente Invention sera mieux comprise à
20 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de préparation de baculovirus recombinants conformes à l'invention, et à leur utilisation pour la production d'immunoglobulines dans des cellules d'insectes.

25 Il doit être bien entendu toutefois que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'Invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.



Exemple 1. : Construction d'une cassette chaîne légère Kappa, (pBCK) (Figure 1) :

a- Plasmide pGmAc116T :

Ce vecteur de transfert est dérivé du plasmide pGmAc115T [ROYER et al., J. Virol., 66, 3230-3235, (1992)], lui-même dérivé du plasmide pAc1 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)] contenant le fragment EcoRI-I du baculovirus de la polyédrose nucléaire d'*Autographa californica* (AcMNPV), et donc le gène polyédrique, et les séquences flanquant ledit gène. Pour obtenir pGmAc116T, le plasmide pGmAc115T a été délété d'un fragment de 1900pb allant d'un site EcoRI situé en amont du gène polyédrique à un site XhoI situé 1900pb en aval de ce site EcoRI. La délétion a été effectuée par coupure exhaustive XhoI, suivie d'une coupure partielle par EcoRI. 5 µg du plasmide pGm115T ont été digérés pendant 2 heures à 37°C par 15 unités d'enzyme XhoI (Boehringer), dans un volume réactionnel de 50 µl et dans les conditions préconisées par le fournisseur. L'enzyme a été éliminée par une extraction au phénol/chloroforme et l'ADN plasmidique a été précipité à l'alcool. Cet ADN a été ensuite partiellement coupé par EcoRI (Boehringer) dans un volume réactionnel de 50 µl en présence de 0,5 unité d'enzyme. L'incubation a été faite à 37°C pendant 20 minutes. Après une nouvelle extraction au phénol/chloroforme, les extrémités générées par les coupures XhoI et EcoRI ont été rendues franches par l'enzyme de Klenow (Biolabs) en présence des 4 dNTPs selon le protocole préconisé par le fournisseur. L'ADN plasmidique a enfin été précipité à l'alcool et incubé avec la ligase du phage T4 (Boehringer) dans les conditions préconisées. Des bactéries *E. coli* compétentes ont été transformées par une partie du mélange de ligation, le criblage des colonies issues de cette transformation a permis de sélectionner le plasmide pGmAc116T.

b- Les promoteurs :

Le promoteur p10 ou le promoteur polyédrique du virus de la polyédrose nucléaire de *Spodoptera littoralis* (SlMNPV) sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces permettant de reconstituer un site EcoRV en amont du promoteur, et un site BglII en aval. Le produit d'amplification est digéré par EcoRV et BglII, et les fragments portant les séquences promotrices sont insérés dans pGmAc116T préalablement digéré par ces mêmes enzymes. La digestion par EcoRV et BglII permet d'éliminer le promoteur polyédrique de AcMNPV, et de le remplacer par l'un des deux promoteurs cités plus haut.

Les plasmides obtenus sont respectivement appelés pGmAc10 (promoteur de la p10), ou pGmAc33 (promoteur de la polyédrique).

c- Peptide signal :

La séquence codante choisie pour le peptide signal est la suivante :

5'-ATG AAA CAC CTG TGG TTC TTC CTC CTC CTG GTG GCC GCT
CCC AGA TGG GTC CTG TCG-3'

Cette séquence a été choisie à partir des séquences publiées par Van ES J.H., HEUTINK M., AANSTOOT H., and LOGTENBERG T. [Journal of Immunology 149, 492-497, (1992)].

Cette séquence a été synthétisée chimiquement sous forme de deux oligonucléotides complémentaires (OPP-HuPS-5' et OPP-HuPS-3') ayant des extrémités permettant l'insertion du duplex dans un site BglII. A l'une des extrémités du duplex, il y a une séquence correspondant à celle du début de la "charpente 1" (framework 1) des chaînes légères (avec le site SacI), suivie d'une séquence portant un site XhoI. Deux modifications (soulignées dans la séquence ci-dessus) ont été réalisées pour optimiser l'usage des codons de cette séquence dans le système baculovirus. Pour l'appariement, 15 µg de chacun des deux oligonucléotides sont incubés dans 50 µl

de tampon (Tris 1 mM pH 7,5, EDTA 0,1 mM), pendant 5 minutes dans un bain marie à 70°C. Le bain est ensuite laissé refroidir jusqu'à température ambiante (22 à 25°C). Le mélange est utilisé directement dans les réactions de ligation avec les plasmides pGmAc10 ou pGmAc33 préalablement coupés par BglII.

Les conditions de ligation sont les suivantes :

1µg du plasmide pGmAc choisi coupé par BglII, 1µg de l'oligonucléotide bicaténaire portant la séquence codant pour le peptide signal, 2µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau distillée q.s.p. 19µl, 1 unité (1µl) de ligase (BOEHRINGER) ; l'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

d- Région constante :

La séquence codante de la région constante de la chaîne légère κ humaine a été amplifiée par PCR en utilisant comme matrice de l'ADNc de lymphocytes B humains. Les lymphocytes humains (environ 5×10^8) ont été préparés à partir de 200 ml de sang en utilisant HISTOPAQUE® (SIGMA). L'ARN total a été extrait de ces lymphocytes en utilisant un kit PHARMACIA (RNA extraction kit). Le premier brin d'ADNc a été préparé à partir de l'ARN total à l'aide du kit "First-Strand cDNA synthesis kit" de PHARMACIA.

Les amorces utilisées pour amplifier le cDNA CK sont les suivantes :

* HuCKBAC :

5'-AG CTC GAG ATC AAA CGG-3'
(le site XhoI est souligné).

Cette amorce correspond à une séquence consensus en 3' des séquences codant pour les domaines variables des chaînes légères d'immunoglobulines de souris (JK), et contient un site de coupure par XhoI.

* HuCKFOR :

5'-GAA GAT CTA ACA CTC TCC GCG GTT GAA G-3'

(le site BglII est souligné).

5 Cette amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des gènes CK humains et apporte un site BglII en aval du codon stop TAG.

10 L'amplification avec les amorces HuCKBAC et HuCKFOR a permis d'obtenir un fragment d'environ 340 pb contenant la totalité de la région CK encadrée des sites XhoI et BglII.

Le produit de l'amplification a été digéré par BglII et XhoI avant d'être cloné dans les sites XhoI-BglII des plasmides pGmAc portant la séquence codant pour le peptide signal, pour donner les plasmides pBCk.

15 La composition du mélange de ligation est la suivante :

20 1µg du plasmide pGmAc coupé par XhoI et BglII ; 200 ng du fragment Ck amplifié et digéré par BglII et XhoI, 2µl de tampon ligase 10X (BOEHRINGER), eau distillée q.s.p. 19µl, 1 unité (1µl) de ligase (BOEHRINGER).

L'incubation est effectuée à 22°C pendant 2 heures ; le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries *E.coli* compétentes.

25 **Exemple 2 - Cassette chaîne légère Lambda (pBCλ) (figure 2) :**

a. Région constante Cλ :

30 Comme pour la séquence codante de la région constante Ck, la séquence codante Cλ a été obtenue par amplification par PCR de l'ADN complémentaire des ARN messagers de lymphocytes B humains.

35 L'amplification par PCR de la région Cλ a été réalisée en présence de l'amorce OPP-HuCλ3' complémentaire de l'extrémité 3' des régions Cλ et apportant le site de restriction BglII et de l'amorce OPP-HuCλ5' complémentaire de l'extrémité 5' des régions Cλ

et apportant le site de restriction XhoI.

Les séquences des deux amorces sont les suivantes :

*OPP-HuCl λ 3' :

5'-CCT GTC AGA TCT ATG AAC ATT CTG TAG GGG-3'
(site BglII souligné)

*OPP-HuCl λ 5' :

5'-CCG CCC TCC CTC GAG CTT CAA-3'
(site XhoI souligné)

Après coupure par les enzymes BglII et XhoI, la séquence Cl λ amplifiée est insérée entre les sites XhoI et BglII du plasmide pBCK, préalablement délété du gène Ck par traitement par les enzymes BglII et XhoI et purification du fragment plasmidique de 7,8 kb.

Le plasmide obtenu est dénommé pBC λ .

L'insertion de la région constante lambda a été vérifiée par séquençage du plasmide pBC λ en présence des deux amorces OPP-HuCl λ 3' et OPP-HuCl λ 5'.

La cassette chaîne lambda (Cl λ) est destinée au clonage des parties variables de chaînes légères de type lambda.

Ces parties variables sont amplifiées par PCR en utilisant d'une part une amorce (OPP-HuV λ 5') qui hybride au niveau de la charpente 1 des chaînes légères et qui permet de reconstituer un site SacI, et d'autre part une amorce (OPP-HuV λ 3') qui est quasiment complémentaire de l'amorce OPP-HuCl λ 5' et qui permet de reconstituer un site XhoI.

Les séquences de ces amorces sont les suivantes :

* OPP-HuV λ 5' :

5'-CA(GC)TCTGAGCTCAC(GT)CAG-3'
(site SacI souligné)

* OPP-HuV λ 3' :

5'-TTG AAG CTC CTC GAG GGA GGG CGG GAA-3'
(site XhoI souligné)

Exemple 3 - Cassette chaîne lourde $\gamma 1$ (pBC $\gamma 1$)**(figure 3) :**

a- Plasmide de transfert :

Le plasmide pGm16 [BLANC et al, Virology, 192, 651-654, (1993)] dérive d'un plasmide dans lequel a été cloné le fragment EcoRI-P du baculovirus AcMNPV contenant le gène p10. La quasi-totalité de la séquence codante a été délétée et remplacée par un site BglIII permettant l'insertion de séquences à exprimer sous le contrôle du promoteur p10.

b- Le peptide signal :

La séquence codante de ce peptide est celle d'un gène VH de souris (NEUBERGER M.S., 1983. EMBO J, 2, 1373-1378) :

5'-ATG GGA TGG AGC TGT ATC ATC CTC TTC TTG GTA GCA ACA
GCT ACA GGT GTC CAC TTC-3'

Elle a été synthétisée chimiquement sous forme de brins complémentaires, de manière à ce qu'elle puisse être insérée dans un site BglIII (figure 3). Les conditions d'appariement et de ligation sont identiques à celles utilisées pour le clonage de la séquence codante du peptide signal utilisée pour la chaîne légère.

c- Régions constantes humaines :

- IgG1 (C γ 1)

Le cDNA de la séquence codante de la région C γ 1 humaine a été amplifié par PCR en utilisant les amorces suivantes :

*HuC γ 1BAC :

5' CAA GGT ACC ACG GTC ACC GTC TCC - 3'
(site KpnI souligné).

Cette amorce correspond à une séquence consensus des régions JH murines (extrémités 3' des régions variables des chaînes lourdes murines), et comprend un site KpnI.

*HuCylFOR :

5'-GAAGATC TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA G-3'

(site BglII souligné).

5 La séquence a été déterminée à partir de séquences Cyl humaines. L'amorce est complémentaire de l'extrémité 3' des Cyl humaines, et permet de reconstituer après amplification un site BglII en aval du codon stop.

10 La matrice utilisée pour amplifier la région Cyl humaine est le même mélange d'ADNc que celui utilisé pour l'amplification des séquences codantes Ck et Cl

Le produit d'amplification a été séquencé et cloné dans le vecteur de transfert pGm16 portant la séquence codant pour le peptide signal. La construction obtenue a été appelée pBCyl (figure 3).

15 Pour l'amplification des régions constantes des immunoglobulines IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgM et IgA, on utilise comme amorce 5' l'amorce HuCylBAC ci-dessus associée respectivement aux amorces 3' suivantes :

- IgG2 :
20 HuCylFOR,
- IgG3 :
HuCylFOR,
- IgG4 :
HuCylFOR,
- IgE :
25 5'- GAAGATC TCATTT ACC GGG ATT TAC AGA- 3',
- IgM :
5'-GAAGATC TCA TTT ACC GGT GGA CTT GTC GTC-3',
- IgA :
30 5-GAAGATCTCA GTA GCA GGT GCC GTC CAC CTC-3'.

Pour les régions constantes des IgG1, 2, 3 et 4, la même amorce est utilisée en 3' en raison de la grande conservation de séquences entre les différentes sous-classes dans cette partie. Pour les amorces
35 utilisées pour les IgE, les IgM et les IgA, les sites de coupure BglII introduits sont soulignés.

Exemple 4 - Expression d'un anticorps chimère (souris-Homme) dans des cellules d'insecte infectées par un vecteur conforme à l'invention :

Le MAb K20 est un anticorps murin produit par un hybridome. Il est dirigé contre la sous-unité β des récepteurs CD29 des lymphocytes [BOUMSELL et al., J. Exp. Med. 152, p. 229 (1980)]. Un baculovirus recombinant conforme à l'invention a été utilisé pour exprimer un anticorps K20 chimère ayant les régions variables du K20 d'origine et les régions constantes humaines provenant des cassettes pBCK et pBCyl.

1. Clonage de la région variable de la chaîne légère κ de K20 :

L'ARN total de l'hybridome a été extrait à l'aide du kit "RNA extraction Kit" de PHARMACIA, et une transcription inverse a été réalisée en utilisant l'amorce VKFOR (First-Strand cDNA Synthesis kit ; PHARMACIA) :

*VKFOR : 5'- CCG TTT GAT CTC GAG CTT GGT CCC 3' (site XhoI souligné)

Cette amorce est complémentaire de la séquence consensus à l'extrémité 3' de la région variable VK des gènes murins. Elle est destinée à amplifier les VK réarrangées avec les jonctions JK1 ou JK2 (qui sont les plus répandues), mais également celles réarrangées avec les jonctions JK4 ou JK5.

Le cDNA a été amplifié par PCR en utilisant d'une part l'amorce VKFOR et d'autre part l'amorce VK2BAC: *VK2BAC : 5'- GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA -3' (site SacI souligné).

La séquence de cette amorce est identique à une séquence précédemment publiée [WINTER et CLACKSON, Nature, 352, p 624, (1991)]. VK2BAC est capable d'amplifier les régions variables murines VK3, VK4 et VK6.

Après amplification de la région VKK20, une digestion SacI-XhoI du produit d'amplification a été

réalisée et le fragment obtenu a été cloné entre les sites SacI et XhoI du plasmide chaîne légère pBCK pour donner le plasmide pBVkK20HuCK (figure 4A).

2- Clonage de la région variable de la chaîne lourde $\gamma 1$ de K20 :

La transcription inverse sur l'ARN total extrait de l'hybridome producteur de K20 a été réalisée en utilisant l'amorce VHFOR. Cette même amorce, et l'amorce VH1BAC ont par la suite servi à amplifier la région VH à partir de l'ADNc :

*VHFOR : 5'-TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT aCC TTG GC-3'
(Site KpnI souligné).

*VH1BAC : 5'-AG GT(C/G) (A/C)A(A/G) CTG CAG (C/G) AG
TC(A/T) GG-3'

(Site PstI souligné).

VHFOR est identique à une amorce décrite par ORLANDI et al. (1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3833-3837), la seule différence se situant au niveau du "a" qui remplace un "C" (cf. site KpnI souligné ci-dessus).

Après amplification et digestion par PstI et KpnI, la région VH de K20 a été insérée dans le plasmide chaîne lourde au niveau des sites PstI-KpnI. Le plasmide chargé a été appelé pBVHK20HUC $\gamma 1$ (figure 4B).

3- Construction d'un virus recombinant produisant le K20 chimère (figure 5):

a- Insertion de la chaîne lourde :

Le plasmide chargé pBVHK20HUC $\gamma 1$ a été utilisé en cotransfection avec l'ADN d'un baculovirus modifié appelé AcSLp10 [CHAABIHI et al., J. Virol., 67, 2664-2671 (1993)], qui est dépourvu du gène polyédrique (promoteur+séquence codante), mais porte la séquence codante de la polyédrique sous contrôle du promoteur P10, dans le locus naturel P10. Ce virus produisant des polyédres dans les cellules infectées, la recombinaison au niveau du locus P10 peut ainsi être facilement

détectée. Les conditions de cotransfection sont les suivantes : 500 ng d'ADN viral sont mélangés avec 5 µg d'ADN plasmidique et 40 µl de solution DOTAP (BOEHRINGER) dans 3 ml de milieu de culture sans sérum pour cellules d'insectes. Ce mélange est utilisé pour recouvrir 4×10^6 cellules Sf9 (ATCC35CRL 1711) ; après 4 heures de contact, le mélange de cotransfection est remplacé par 4 ml de milieu complet et l'incubation est faite à 27°C pendant 5 jours.

10 A la suite de la cotransfection, le virus produisant la chaîne lourde de l'anticorps K20 chimère sous le contrôle du promoteur P10 a été purifié par la technique des plages de lyse. Ce virus a été appelé AcSLp10-K20H.

15 b- Insertion de la chaîne légère :

Le plasmide chargé pBVKK20HUCK a été utilisé en cotransfection avec l'ADN du baculovirus modifié AcSLp10-K20H.

20 Les doubles recombinants ont été sélectionnés par la technique de la dilution limite, associée à l'ELISA et/ou à l'hybridation moléculaire.

Après la cotransfection, on effectue une gamme de dilutions du surnageant infectieux, et chaque dilution est utilisée pour l'infection de cellules d'insectes. 25 Trois jours après l'infection, les surnageants sont testés en ELISA pour rechercher la présence d'anticorps de type humain correctement assemblés. Les surnageants des puits les plus positifs pour les dilutions les plus importantes sont à leur tour dilués et utilisés pour 30 infecter d'autres cultures ; après quelques cycles dilution/infection, les surnageants enrichis en baculovirus produisant l'anticorps entier sont étalés sur un tapis cellulaire, et clonés par la méthode des plages de lyse.

Exemple 5 - Production et purification de l'anticorps K20 :

Le virus double recombinant a été amplifié par une série de passages sur des cellules d'insecte en culture. Le stock viral a été ensuite utilisé pour infecter une culture agitée en spinner (500 ml de culture à 10^6 cellules par ml).

Après 72 heures d'infection, la culture est récoltée et centrifugée à 1000 g pour clarifier le surnageant. Ce dernier a été concentré jusqu'au 1/3 de son volume initial par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 30 kDa (CENTRIPEP 30, Amicon) (1ère centrifugation : 1000g, 20°C, 30 minutes ; élimination du filtrat ; 2ème centrifugation : 1000g, 20°C, 20 minutes).

La solution a été équilibrée dans un tampon de fixation sur protéine A, par dilution dans ce tampon suivie d'une nouvelle concentration par centrifugation (tampon de dilution : Glycine 1,5M, NaCl 3M; pH 8,9). La solution équilibrée est ensuite passée dans une colonne de protéine A, elle même équilibrée dans le même tampon que la solution de K20. Après rinçage de la colonne, l'anticorps est élué par un tampon d'élution (Acétate 0,1M, NaCl 0,5M; pH 3). L'élution est suivie en mesurant la DO à 280 nm. Les fractions contenant l'anticorps ont été mélangées et concentrées par centrifugation à travers une membrane ayant un seuil de coupure de 10 kDa (CENTRIPEP 10, AMICON). La solution concentrée est diluée avec du PBS puis reconcentrée de la même manière. La solution d'anticorps obtenue est conservée à +4°C dans le PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4 mM KH_2PO_4).

La qualité de l'anticorps a été contrôlée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS, en utilisant comme témoin une IgG1 humaine du commerce (SIGMA). Cette expérience a montré que l'anticorps

chimère non-réduit (ponts disulfure intacts) migre au même niveau que l'anticorps humain témoin.

5 Après traitement par le dithiotréitol (DTT), on observe l'apparition de deux bandes correspondant aux chaînes lourdes et légères, et migrant au même niveau que les chaînes de l'anticorps humain témoin également réduit au DTT.

10 Pour confirmer les résultats précédents, les protéines des fractions comprenant l'anticorps ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose, et les chaînes H et L ont été détectées par des anticorps spécifiques des région C γ 1 et C κ humaines.

15 Cette expérience démontre que l'anticorps produit par les cellules d'insectes est bien constitué de chaînes H et L, et que les parties constantes de ces chaînes sont reconnues par des anticorps spécifiques.

Exemple 6 - Test de l'activité et de la spécificité du K20 produit par les cellules d'insectes :

20 L'anticorps monoclonal K20 est dirigé contre la sous unité β 1 des intégrines humaines (récepteur CD29) localisée à la surface des lymphocytes. La fixation de K20 sur la molécule CD29 inhibe la prolifération des lymphocytes T4 humains activés [GROUX et al., Nature, 339, 152-154, (1989)]. L'effet suppressif de K20 sur la
25 prolifération cellulaire T permet d'envisager l'utilisation de cet anticorps dans la prévention des rejets de greffes. Pour tester l'activité de l'anticorps K20 chimérique produit conformément à l'invention, deux types d'expériences ont été réalisés :
30 l'immunofluorescence et l'inhibition de la prolifération lymphocytaire T. Les protocoles expérimentaux suivis ont pour l'essentiel été précédemment décrits [GROUX et al. Nature 339, 152-154 (1989); TICCHIONI et al. Journal of Immunology 151, 119-127 (1993)].

1- Expériences d'immunofluorescence :

Des lymphocytes humains portant le récepteur CD29 ont été fixés sur lame de verre puis incubés en présence du K20 chimérique produit conformément à l'Invention, du K20 murin d'origine, ou du tampon seul.

Après une série de rinçages, on rajoute ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du K20 chimérique produit conformément à l'Invention, ou bien un anticorps secondaire fluorescent spécifique du K20 murin d'origine.

Après un nouveau rinçage, les préparations ont été observées au microscope pour visualiser la fluorescence. Ceci a montré que le K20 chimérique produit conformément à l'Invention se fixe de manière spécifique sur les lymphocytes portant le CD29, tout comme le témoin positif K20 murin d'origine ; aucune fluorescence n'a été détectée en l'absence des anticorps K20.

2- Inhibition de la prolifération des lymphocytes CD4⁺ par K20 :

Des lymphocytes humains CD4⁺ ont été activés par un anticorps anti-CD3 en présence d'interleukine-2. Les anticorps K20 chimérique conforme à l'Invention, ou K20 murin d'origine ont été rajoutés (20 µg/ml) pour vérifier leur effet sur la prolifération lymphocytaire. Une expérience avec un anticorps non-inhibiteur [GROUX et al. Nature, 339, p 152, (1989)] a été réalisée pour servir de témoin négatif.

La prolifération est mesurée en comptant la quantité de thymidine ³H incorporée après 4 jours de culture suite aux traitements par les anticorps. On observe 50 à 70% d'inhibition de la prolifération quand les cellules ont été incubées avec l'anticorps K20 produit conformément à l'Invention.

L'anticorps K20 murin d'origine (témoin positif) inhibe également la prolifération des lymphocytes activés dans les mêmes proportions : 50 à 70%.

REVENDEICATIONS

1) Baculovirus recombinant, constituant un vecteur d'expression utilisable pour la production d'immunoglobulines dans une cellule d'insecte, et caractérisé en ce qu'il comprend :

- une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne H d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort de baculovirus, ou d'un dérivé dudit premier promoteur, et ;

- une cassette d'expression comprenant une séquence codant pour au moins une partie d'une chaîne L d'une immunoglobuline, laquelle séquence est placée sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort de baculovirus, ou d'un dérivé dudit second promoteur ;

le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents et le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents et l'un des promoteurs étant situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la polyédrine et l'autre étant situé à l'emplacement occupé chez le baculovirus sauvage, par le promoteur de la P10.

2) Baculovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur fort de baculovirus, et sous contrôle dudit promoteur : (ii) une séquence codant pour un peptide signal ; (iii) une séquence codant pour un domaine variable d'immunoglobuline ; (iv) une séquence codant pour un domaine constant d'une chaîne H ou L d'immunoglobuline.

3) Baculovirus recombinant selon la revendication 1, caractérisé en ce que chaque cassette d'expression comprend : (i) un promoteur fort de baculovirus, et sous contrôle dudit promoteur : (ii) une séquence codant pour un peptide signal ; (iii) au moins

un site permettant l'insertion d'une séquence codant pour un domaine variable d'immunoglobuline entre la séquence codant pour la partie constante et la séquence codant pour le peptide signal ; (iv) une séquence codant pour au moins une partie d'un domaine constant d'immunoglobuline.

5 4) Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que la séquence codant pour un peptide signal placée sous contrôle du premier promoteur, est différente de la
10 séquence codant pour un peptide signal placée sous contrôle du second promoteur.

 5) Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce qu'au moins une des séquences codant pour un peptide
15 signal code pour un peptide signal d'immunoglobuline.

 6) Baculovirus recombinant selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que la séquence codant pour le domaine constant d'immunoglobuline est une séquence d'origine humaine.

20 7) Baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'un des promoteurs est le promoteur de la p10 ou l'un de ses dérivés, et l'autre promoteur est le promoteur de la polyédrine ou l'un de ses dérivés.

25 8) Cellules d'insecte, caractérisée en ce qu'elles sont infectées par un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 7.

 9) Procédé de préparation d'une immunoglobuline, caractérisé en ce que l'on met en
30 culture des cellules d'insecte, infectées par un baculovirus selon l'une quelconque des revendications 1, 2, ou 4 à 7 et en ce que l'on extrait ladite immunoglobuline à partir du milieu de culture.

 10) Immunoglobuline, caractérisée en ce
35 qu'elle est susceptible d'être obtenue par le procédé selon la revendication 9.

11) Procédé de préparation d'un baculovirus recombinant selon une quelconque des revendications 1 à 7, lequel procédé est caractérisé en ce que :

5 - l'on prépare un premier plasmide de transfert comprenant une séquence codant pour au moins une partie de chaîne H d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un premier promoteur fort d'un baculovirus, ou d'un dérivé dudit premier promoteur ;

10 - l'on prépare un second plasmide de transfert comprenant la séquence codant pour au moins une partie de chaîne L d'immunoglobuline, sous contrôle transcriptionnel d'un second promoteur fort dudit baculovirus, ou d'un dérivé dudit second promoteur ;

15 le premier et le second promoteur étant deux promoteurs différents ou des dérivés de promoteurs différents ;

- l'on procède à la recombinaison homologue de l'un et de l'autre desdits plasmides avec l'ADN d'un baculovirus ;

20 - après répllication de l'ADN viral dans les cellules transfectées, l'on procède à la sélection des baculovirus recombinants ayant intégré la séquence hétérologue.

25 12) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que chaque plasmide de transfert utilisé porte un insert comprenant :

30 - une cassette d'expression telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 7 et, de part et d'autre de cette cassette, des séquences de baculovirus homologues de celles des régions flanquant la portion du génome viral en remplacement de laquelle on souhaite insérer ladite cassette.

13) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdites séquences de baculovirus

sont homologues de celles des régions flanquant le gène de la p10, ou homologues de celles des régions flanquant le gène de la polyédrine.

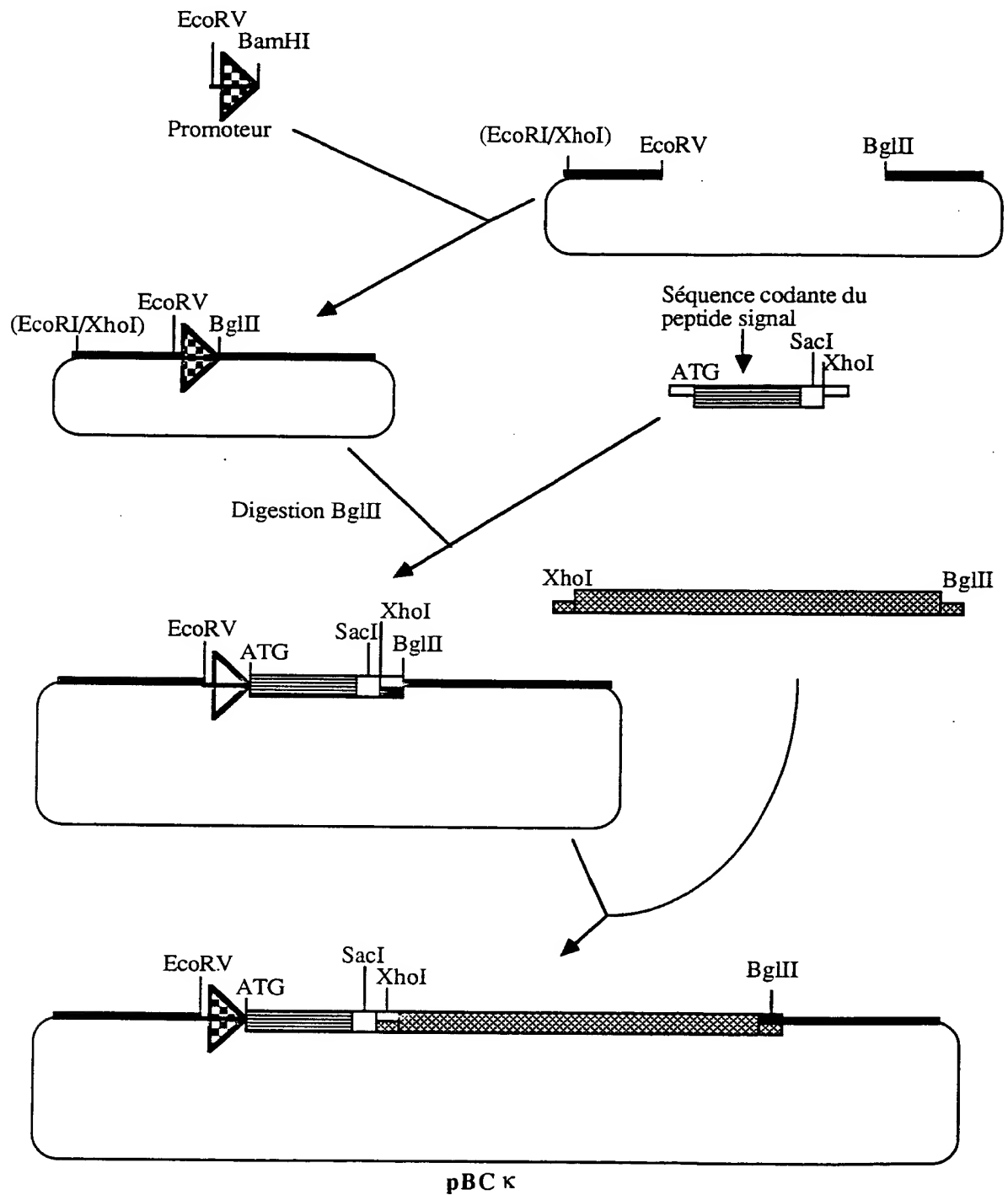


FIGURE 1

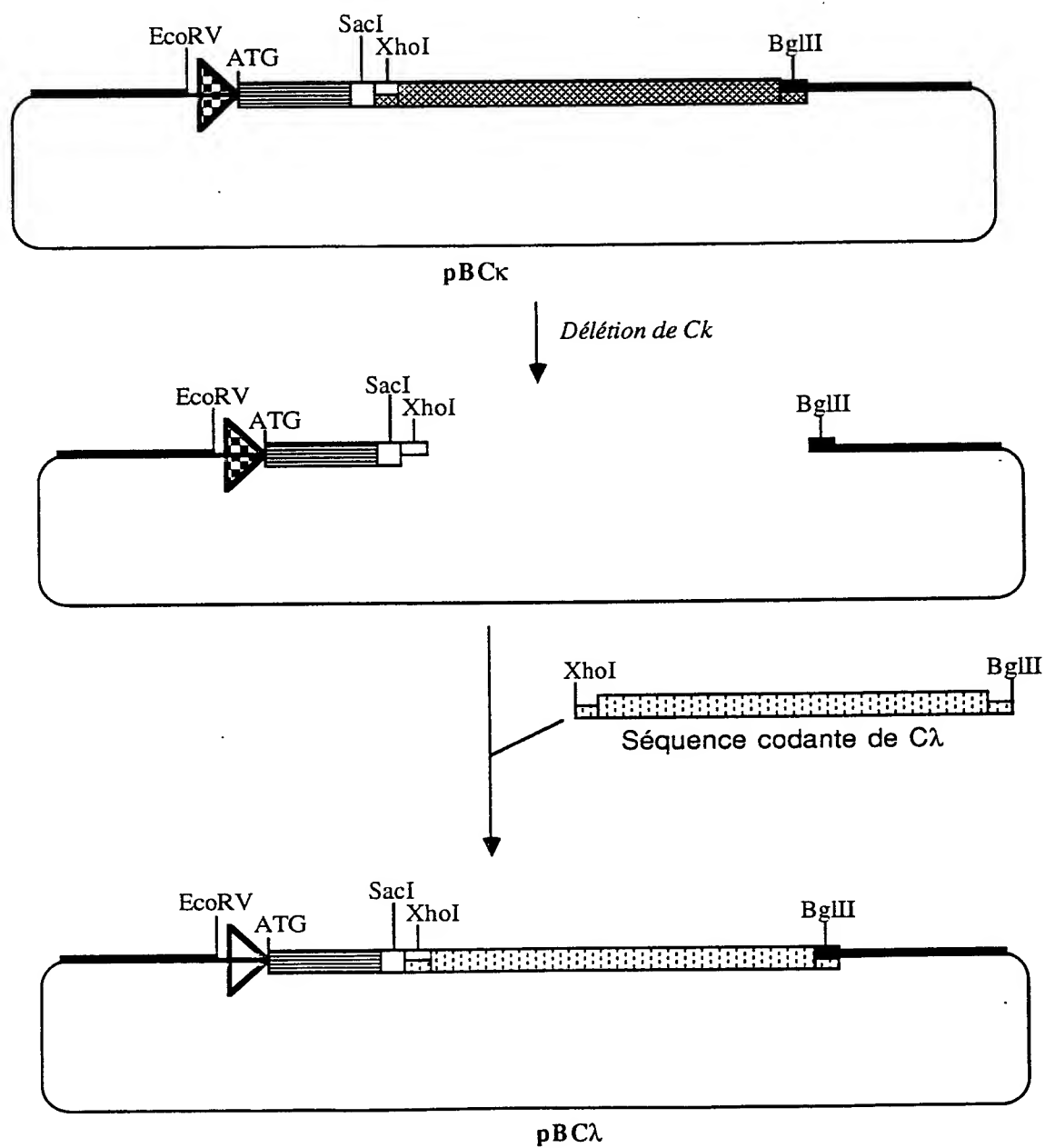


FIGURE 2

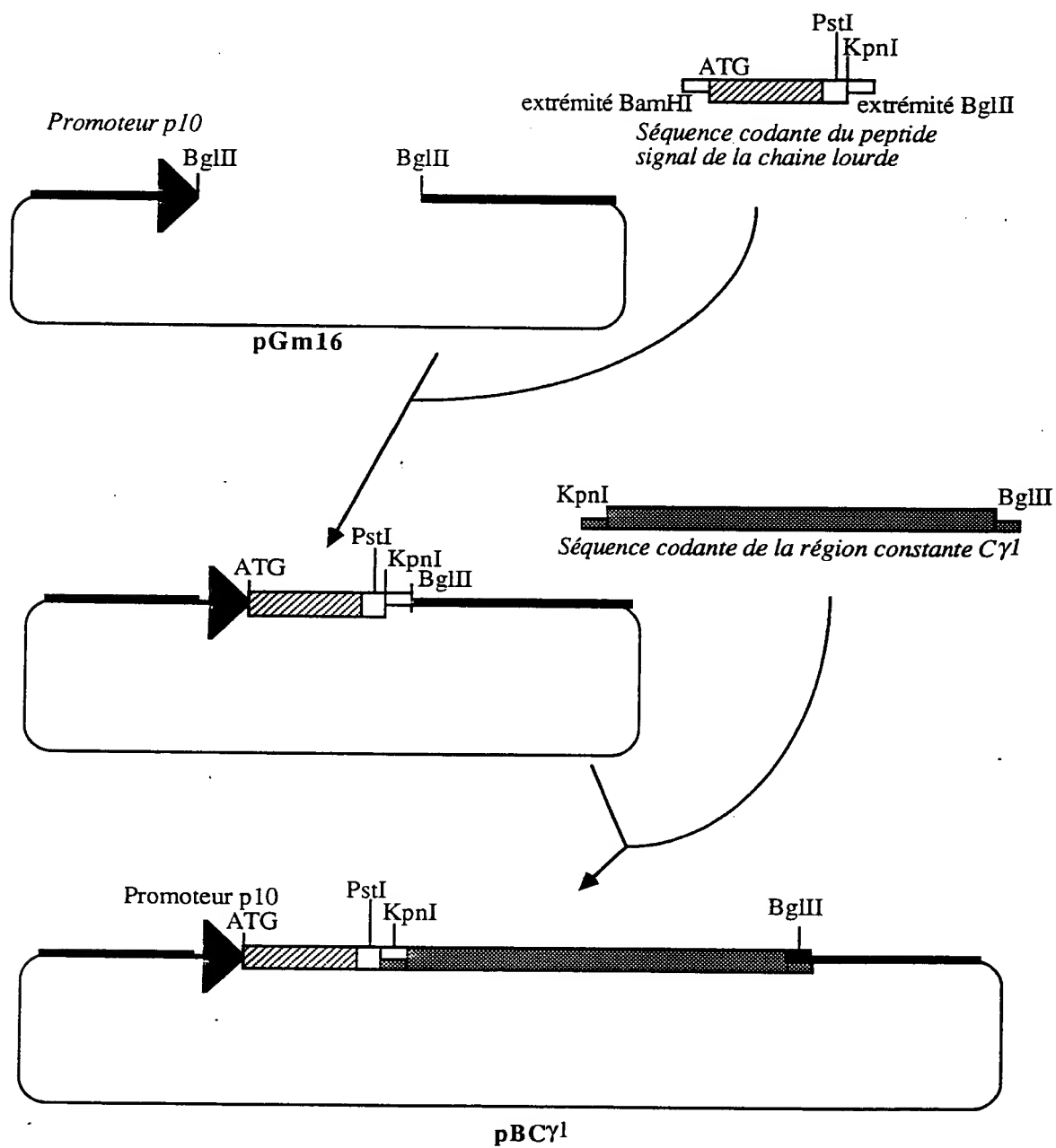
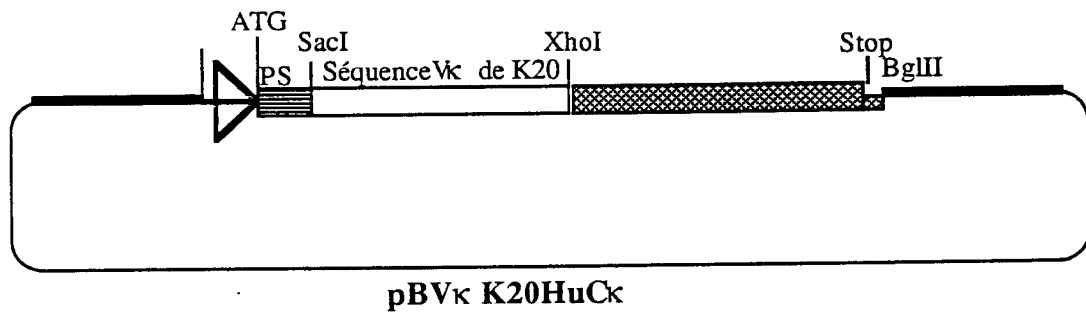


FIGURE 3

A.



B.

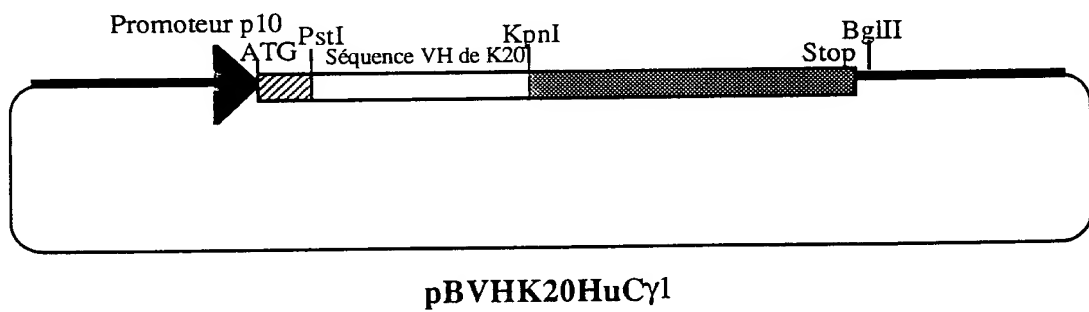


FIGURE 4

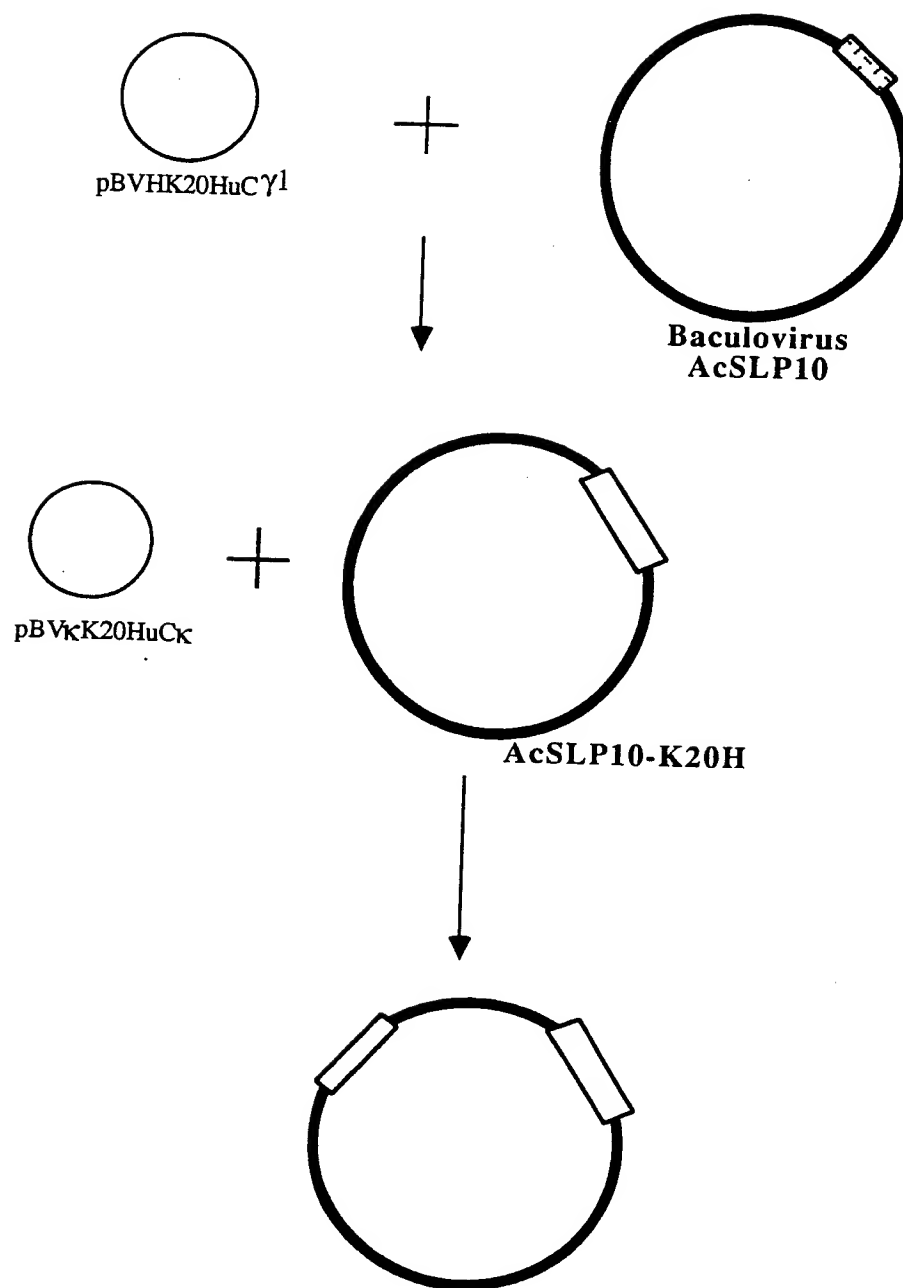


FIGURE 5

